

(54) PREPARATION OF L-LACTIC ACID

(11) 57-144985 (A) (43) 7.9.1982 (19) JP
 (21) Appl. No. 56-28778 (22) 27.2.1981
 (71) TANABE SEIYAKU K.K. (72) ICHIROU SENHATA(3)
 (51) Int. Cl.³ C12P7/56//C12P7/56,C12R1/44

PURPOSE: To prepare L-lactic acid efficiently and to make this process suitable for industrialization, by using a bacterium mold (immobilized lactic acid bacteria) capable of producing L-lactic acid, immobilized on a gelatinous carrier.

CONSTITUTION: Lactic acid bacteria such as *Streptococcus faecalis* IFO 3865, etc. are cultivated in glucose, yeast extract, peptone, etc. as a nutritive medium at 25~42°C at a pH of 4.5~6.5, and a condensed mold layer is formed at a position near to the gel surface, to give immobilized propagated lactic acid bacteria. This immobilized propagated lactic acid bacteria are subjected to catalytic reaction with a nutrient medium containing a saccharide or an organic acid to prepare L-lactic acid. Glucose, sucrose, lactose, etc. may be cited as the saccharide as a raw material for producing L-lactic acid, and pyruvic acid, malic acid, etc. may be cited as the organic acid.

(54) PREPARATION OF LIPID HAVING HIGH CONTENT OF γ -LINOLENIC ACID

(11) 57-144986 (A) (43) 7.9.1982 (19) JP
 (21) Appl. No. 56-31055 (22) 3.3.1981
 (71) KOGYO GIJUTSUIN (JAPAN) (72) OSAMU SUZUKI(2)
 (51) Int. Cl.³ C12P7/64//C12P7/64,C12R1/645

PURPOSE: To prepare lipid having a γ -linolenic acid content of $\geq 20\text{wt}\%$ based on the fatty acid composition of total lipid, by cultivating a mold of the genus *Mortierella* in a medium using a hydrocarbon as a carbon source.

CONSTITUTION: A mold such as *Mortierella esobellina* belonging to the genus *Mortierella* IFO-7824, IFO-7884, etc., capable of producing lipid, is inoculated into a nutrient medium using kerosene, n-decane, undecane, etc. as a carbon source, and cultivated at a pH of preferably 4.0~6.0 at 10~33°C by settled culture, shaking culture, aerated spinner culture, etc., and lipid having a high content of γ -linolenic acid is collected from the cultivated mold.

(54) PRODUCTION OF AMINO ACID BY IMMOBILIZED PROTOPLAST

(11) 57-144989 (A) (43) 7.9.1982 (19) JP
 (21) Appl. No. 56-30920 (22) 4.3.1981
 (71) AJINOMOTO K.K. (72) SHIYUICHI SUZUKI(1)
 (51) Int. Cl.³ C12P13/04//C12N11/04,C12P13/14,C12R1/00

BEST AVAILABLE COPY

PURPOSE: To obtain high-quality amino acid continuously for a long time without causing the reduction in amino acid producing ability, by using immobilized protoplast prepared from a bacterium capable of producing amino acid.

CONSTITUTION: The cell wall of a bacterium such as *Brevibacterium flavum* ATCC14067, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, etc., capable of producing amino acid, is removed, to give protoplast, which is immobilized by an inclusion method using agar, polyacrylamide gel, etc. by a well-known process, to give immobilized protoplast. The immobilized protoplast is brought into contact with a solution of a reactive substrate containing at least a carbon source and a nitrogen source, and the amino acid formed and accumulated in the solution is collected.

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭57—144986

⑤ Int. Cl.³
C 12 P 7/64
// (C 12 P 7/64
C 12 R 1/645)

識別記号

庁内整理番号
6760—4B

⑬ 公開 昭和57年(1982)9月7日

発明の数 1
審査請求 有

(全 3 頁)

⑭ γ-リノレン酸含量の高い脂質の製造方法

茨城県筑波郡谷田部町東1丁目
1番地化学技術研究所内

⑮ 特 願 昭56—31055

⑯ 発 明 者 中里敏

⑰ 出 願 昭56(1981)3月3日

茨城県筑波郡谷田部町東1丁目
1番地化学技術研究所内

⑱ 発 明 者 鈴木修

茨城県筑波郡谷田部町東1丁目
1番地化学技術研究所内

⑲ 出 願 人 工業技術院長

⑳ 指定代理人 工業技術院化学技術研究所長

㉑ 発 明 者 横地俊弘

BEST AVAILABLE COPY

明 細 書

1. 発明の名称

γ-リノレン酸含量の高い脂質の製造方法

2. 特許請求の範囲

- (1) モルティエラ属菌を炭化水素を炭素源とする培地に培養し、培養物よりγ-リノレン酸含量の高い脂質を採取することを特徴とする脂質の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明はモルティエラ属の糸状菌を炭化水素を炭素源とする培地に培養し、培養物よりγ-リノレン酸含量の高い脂質〔中性脂質(油脂など)極性脂質(リン脂質、糖脂質)〕を製造する方法に関するものである。

現在までに報告されているγ-リノレン酸を含む微生物としてはムコール・グロボサス(全脂質に対するγ-リノレン酸含量:中性脂質12.3%、極性脂質25.7%、以下、単に中性脂質と極性脂質の含量を示す)、ムコール・ブシルス(中性脂

質1.5%、極性脂質1.4%)〔R.O. Mumma et al., Lipids, 6, 584(1971)〕、ユアネホタ・クダルビタルム(全脂質10.8%)〔H.B. White, Jr., S.S. Rowell, Biochim. Biophys. Acta, 116, 388(1966)〕、ピチウム・テバリアナム(全脂質4.5%)、サブロレグニア・リトラリス(全脂質2.8%)、リゾパス・ストロニファ(全脂質15.6%)、リゾパス・アルヒザス(全脂質9.8%)、ピュミセス・ブラケセスレアヌス(全脂質5.4%)、ムコール・ジャバニカス(全脂質13.7%)、ヘリユスティルム・ビリホルメ(全脂質8.5%)〔R. Shaw, Biochim. Biophys. Acta, 98, 230(1965)〕、エントモフトラ・コナタ(全脂質2.2%)〔R.O. Mumma, T.E. Bruszewski, Lipids, 5, 915(1970)〕等が知られているが、これらはいずれも炭素源が炭化水物であり、含量も極性脂質で一部高い値が出ているが、全脂質でのγ-リノレン酸含量は多くて10数%に過ぎない。

本発明はγ-リノレン酸含量の高い脂質を生産

する糸状菌について研究した結果、モルティエレラ・イサベリナ (*Mortierella isabellira*) [IFO. 7824, 7884] が炭水化物を炭素源とした培地では窒素源濃度、培養温度等を変えて培養を行っても、菌体内の全脂肪酸中に含まれる γ -リノレン酸の含量が一般には5%以下であり、多くて8%程度あったのに対して炭化水素を炭素源とした培地で培養した菌体では、 γ -リノレン酸含量が一般的に全脂質の脂肪酸組成の20%以上、極性脂質では35%に達する脂質を生産することを見出し、本発明は完成するに至った。

すなわち、本発明はモルティエレラ属糸状菌を炭化水素を炭素源とする培地に培養し、培養物により γ -リノレン酸含量の高い脂質〔中性脂質(油脂など)、極性脂質(リン脂質、糖脂質)〕を製造する方法である。

本発明の使用菌の具体例としては、上記した糸状菌が挙げられるが、モルティエレラ属菌であれば、すべて本発明の使用菌として用いることができる。

培養物中に γ -リノレン酸含量の高い脂質が生産されるので、培養物から脂質を採取する脂質の採取にあたっては、脂質が糸状菌の菌体中に含まれるので、培養物より菌体を分離し、この菌体より脂質を採取するのが好適である。脂質の採取は常法に従って例えば溶媒抽出などによって行われる。

かくして、本発明によれば、炭化水素を炭素源として γ -リノレン酸含量の高い脂質を生成することが可能になる。 γ -リノレン酸〔18:3(6, 9, 12)〕はリノール酸と共に哺乳動物では体内で合成することのできない、食飼として要求される脂肪酸(必須脂肪酸)である。これは γ -リノレン酸が体内でビスホモ γ -リノレン酸となり、さらにはアラキドン酸となる前駆体であること、ビスホモ γ -リノレン酸、アラキドン酸はそれぞれプロスタグランジン、 E_1 , F_1 及び E_2 , F_2 となり生体中で極めて重要な生理的な役割をはたしているからである。植物種子などから生産される γ -リノレン酸は α -リノレン酸が大部分を占めており、 γ -リノレン酸を生産するものは少ない。

なお、上記した菌はいずれも財団法人発酵研究所に保存され、IFO カタログ(菌株目録)に記載されている糸状菌である。

上記糸状菌を培養する培地の炭素源である炭化水素としては、例えばケロセン(n -デカン80%含有)、 n -アルカン($C_{10} \sim C_{15}$)、 n -ヘキサデカン、ウンデカン、ヘキサデカンなどが用いられる。炭化水素は培地1ℓ中に10~30ml用いるのが好ましい。また窒素源としては、例えば NH_4NO_3 , $(NH_4)_2SO_4$ などのような無機窒素源、または尿素、ペプトン、酵母エキス、コーン・ステープ・リカーなどの有機窒素源が用いられる。無機塩としては、例えば KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $NaCl$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ などが用いられる。その他必要に応じて微量要素、その他の栄養源を添加する。

上記糸状菌の培養は通常液体培地で静置培養、振とう培養、通気攪拌培養などにより行われる。培地の pH は4.0~6.0が良く、通常10~33℃で5日~30日位培養が行われる。かくして、

この意味で γ -リノレン酸含量の多い脂質の生産は γ -リノレン酸の生産と言う意味においても重要な意義を持っている。

次に本発明の実施例を示すが、本発明はこれにより制限を受けるものではない。

実施例1

n -デカン 12.5 ml, KH_2PO_4 2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 g, $NaCl$ 0.1 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0 mg, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1.0 mg, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.2 mg, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0 mg, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 1.0 mg, Thiamine- HCl 2 mg, D-Biotin 0.02 mg と窒素源として NH_4NO_3 0.91 g, あるいは $(NH_4)_2SO_4$ 0.94 g, あるいは $(NH_2)_2CO$ 0.68 g [C/N比(n -デカン中の炭素原子重量/窒素源中の窒素原子重量)はいずれも24.1] を脱イオン水1000mlに混合し、pHを4.6に調整した。この合成培地400mlを1ℓの三角フラスコに入れ、それぞれ菌株を接種し、所定の温度で所定の期間150 rpmで振とう培養を行った。培養後、ろ過法あるいは遠心分離法で菌体を集め

た。その一部を含水率の定量の為、精秤し、恒温槽中120℃で一昼夜乾燥し、含水率を求め、残りの菌体について脂質の抽出を行った。菌体からの脂質の抽出は、残り湿菌体にクロロホルム-メタノール(2:1 v/v)混液を加え、ガラスビーズ存在下にホモジナイズすることにより菌体の破碎と脂質の抽出を同時に行った。なお、抽出を完全に行うため、これを5回繰返し、全抽出液を集めた。上記抽出液をFlochの分配洗浄法により精製した後、溶媒を減圧留去し、重量法で全脂質量を測定した。

菌体から抽出し、精秤した生成脂質は一部を取りメチルエステル化の後、ガスクロマトグラフィーにより脂肪酸組成を分析した。残りの脂質について、ユニシルを充填剤とし、クロロホルム及びメタノールを展開溶剤とするカラムクロマトグラフィーにより中性脂質と極性脂質に分離し、それぞれの存在量を求めると共に、それぞれの脂質についてもガスクロマトグラフィーを行い、脂肪酸組成を求めた。このような方法により求めたモル

ティエラ属糸状菌の培養条件としての窒素源の違いによる脂質生成量と γ -リノレン酸含量を表に示した。

この表-1の結果から、菌株 *Mortierella isabellina* IFO 7824、7884ともに窒素源にかかわらず、 γ -リノレン酸含量が全脂質に対する場合で18%以上であることが分る。

表-1 (培地400ml 培養日数10日間での比較)

菌 株 名	IFO No	窒素源	培 養 温 度 (℃)	菌体生成 量 DC (g)	生成脂質量 TL		中性脂質 ^{*1} NL/DC (%)	極性脂質 ^{*2} PL/DC (%)	γ -リノレン酸含量		
					(mg)	TL/DC (%)			TL中 (%)	NL中 (%)	PL中 (%)
<i>Mortierella isabellina</i>	7824	尿 素	20	0.839	68.4	8.2	3.1	5.1	34.4	26.8	35.9
			30	1.265	114.1	9.0	4.3	4.7	23.7	17.9	28.3
		硫 安	20	0.290	53.2	18.4	10.9	7.5	24.8	20.3	31.5
			20	0.364	72.0	20.0	13.0	7.0	22.4	18.5	31.6
		尿 素	20	0.720	94.6	13.1	7.7	5.4	29.9	22.6	35.0
			30	0.309	39.5	12.8	4.8	8.0	22.7	15.7	30.5
	7884	硫 安	20	0.484	68.4	14.1	8.8	5.3	24.1	20.7	28.1
			30	0.572	55.9	9.8	5.1	4.7	18.9	14.1	19.1
		硝 安	20	0.660	59.5	9.0	6.1	2.9	25.7	22.1	33.0
			30	0.786	92.6	11.8	7.0	4.8	18.9	15.0	24.7

*1 NL

*2 PL

BEST AVAILABLE COPY